

**ÉTUDE DE LA LIAISON SPÉCIFIQUE
DU ^3H -SPIROPERIDOL DANS LA FRACTION
MEMBRANAIRE DE LA RÉTINE DE MAMMIFÈRE:
SON INTÉRÊT POUR L'ÉVALUATION
DE L'AFFINITÉ DOPAMINERGIQUE
DES SUBSTANCES PSYCHOTROPES**

THÈSE

Présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Pierre MAGISTRETTI
de Chermignon (Valais)

Thèse No 3765



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545903_0015

**ÉTUDE DE LA LIAISON SPÉCIFIQUE
DU ³H-SPIROPERIDOL DANS LA FRACTION
MEMBRANAIRE DE LA RÉTINE DE MAMMIFÈRE:
SON INTÉRÊT POUR L'ÉVALUATION
DE L'AFFINITÉ DOPAMINERGIQUE
DES SUBSTANCES PSYCHOTROPES**

THÈSE

Présentée à la Faculté de médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Pierre MAGISTRETTI
de Chermignon (Valais)

Thèse No 3765

Genève

Service Rapide Offset

1979



La Faculté de médecine, sur préavis du professeur Ralph W. STRAUB, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 24 juillet 1979

Le doyen :
André CRUCHAUD

Thèse No 3765

REMERCIEMENTS

- Au Professeur Ralph W. Straub, j'exprime ma profonde gratitude pour m'avoir conseillé, orienté et guidé tout au long des étapes de ma formation depuis mon entrée au Département de Pharmacologie comme stagiaire, puis comme assistant.
- Au Docteur Michel Schorderet, Privat-Docent, je tiens à exprimer ma sincère amitié et ma reconnaissance pour les conseils, directives et encouragements qu'il m'a prodigués tout au long de l'élaboration de cette thèse.
- Je tiens enfin à exprimer mes vifs remerciements à Madame Nicole Collet, pour avoir dactylographié ce texte, à Monsieur Fred Pillonel pour les figures ainsi qu'à Mademoiselle Gisèle Allenbach et à Messieurs Agostino Masiero et Salvatore Ferrara pour leur précieuse collaboration technique.

TABLE DES MATIERES

	PAGE
I. LA DOPAMINE, NEUROTRANSMETTEUR DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL	1
A. INTRODUCTION	1
B. VOIES DOPAMINERGIQUES	4
1. la voie nigro-striatale	4
2. la voie méso-limbique	4
3. la voie méso-corticale	5
4. la voie tubéro-infundibulaire	5
5. les voies dopaminergiques dans la rétine	5
II. LA RETINE	7
A. ORGANISATION DE LA RETINE	7
B. NEUROTRANSMETTEURS DE LA RETINE	9
C. AMINES BIOGENES DE LA RETINE	9
III. LA LIAISON SPECIFIQUE DU ³ H-SPIROPERIDOL DANS LA RETINE DE MAMMIFERE	11
A. INTRODUCTION	11
1. Généralités sur la méthode	11
2. Critères d'identification d'un récepteur	14
a. saturabilité	14
b. stéréospécificité	14
c. sensibilité au pH et à la température	14

	PAGE
<i>d. linéarité avec la concentration de protéines</i>	14
<i>e. pharmacologie</i>	14
B. MATERIEL ET METHODES	15
1. Préparation du tissu	15
2. Expériences biologiques	16
<i>Principe général</i>	16
C. RESULTATS	19
1. Caractérisation du récepteur	19
<i>a. stéréospécificité</i>	19
<i>b. saturabilité</i>	23
<i>c. influence de la température</i>	23
<i>d. influence du pH</i>	23
<i>e. linéarité avec la concentration de protéines</i>	29
2. Pharmacologie du récepteur à la dopamine dans la rétine	29
<i>a. neuroleptiques</i>	29
<i>b. dopamine et agents dopaminomimétiques</i>	34
<i>c. dérivés de l'ergot de seigle</i>	34
<i>d. autres amines biogènes</i>	35
D. DISCUSSION	35
 <u>CONCLUSION</u>	 41
 <u>REFERENCES</u>	 43

I. LA DOPAMINE, NEUROTRANSMETTEUR DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

A. INTRODUCTION

Cinq critères doivent être remplis pour admettre le rôle de neurotransmetteur (1,2,3) synaptique d'une substance endogène :

1. celle-ci doit être synthétisée et/ou stockée dans les terminaisons nerveuses d'où elle est libérée ;
2. elle doit être libérée à la suite d'une stimulation présynaptique et décelée par conséquent dans l'espace extracellulaire correspondant (fente synaptique) ;
3. elle doit mimer l'action d'une stimulation pré-synaptique, lorsqu'elle est appliquée au niveau post-synaptique ;
4. l'action de la substance doit être bloquée par des antagonistes spécifiques qui généralement empêchent l'interaction du neurotransmetteur présumé avec son récepteur au niveau de la membrane post-synaptique ;
5. il doit exister enfin au niveau de la région post-synaptique un mécanisme d'élimination qui implique soit la dégradation du neurotransmetteur, soit sa diffusion, soit enfin son recapture dans la terminaison pré-synaptique.

L'étude d'un neurotransmetteur peut se faire par différentes approches expérimentales. L'histofluorescence (4,5), la microspectrofluorimétrie (4,6), l'autoradiographie (7) et les dosages chimiques tissulaires (8) permettent d'étudier la localisation du neurotransmetteur. L'étude des voies de synthèse et de dégradation, du stockage, de la libération et du recapture, ainsi que la caractérisation des activités enzymatiques fournissent des informations précieuses sur le

métabolisme et la régulation de l'activité d'un neurotransmetteur.

On peut finalement étudier le site de fixation pré- ou post-synaptique et les conséquences de cette fixation au niveau de la fonction cellulaire. Il s'agit dans ce cas d'interroger le récepteur.

La dopamine (Fig. 1) est une catécholamine localisée dans différentes parties du SNC (voir plus loin), dont le rôle de neurotransmetteur a été largement démontré (9). Il est donc possible d'étudier également le récepteur dopaminergique. Plusieurs auteurs ont montré qu'une adénylate cyclase était couplée à ce récepteur (10,11). En effet, la dopamine et les agonistes dopaminergiques engendrent une accumulation de 3'-5' adenosine monophosphate cyclique (AMPC) dans toutes les régions du SNC où des récepteurs à la dopamine ont été identifiés (10,11,12,13,14), excepté au niveau des cellules mammothrophes de l'hypophyse antérieure (15). Cette augmentation est sélectivement bloquée par les neuroleptiques dont le mode d'action présumé est le blocage de la transmission dopaminergique au niveau post-synaptique (16,17,18,19). En complément à cette méthode enzymatique une autre approche expérimentale peut être utilisée pour la caractérisation du récepteur dopaminergique : il s'agit de la méthode dite de "binding*" (20,21,22). Cette méthode qui a permis la caractérisation des récepteurs aux hormones peptidiques (23,24) et aux stéroïdes (25), a été étendue à l'étude des neurotransmetteurs (26). C'est ainsi que plusieurs groupes de chercheurs ont caractérisé par ce moyen, dans différentes parties du système nerveux, les récepteurs alpha- et bêta-adrénergiques (27,28), cholinergiques (29,30), gabaergiques (31,32), glycinergiques (33), ceux liés

* Ce terme sera utilisé tout au long de la thèse dans le sens de "liaison d'une molécule marquée par un radioisotope avec un récepteur membranaire".

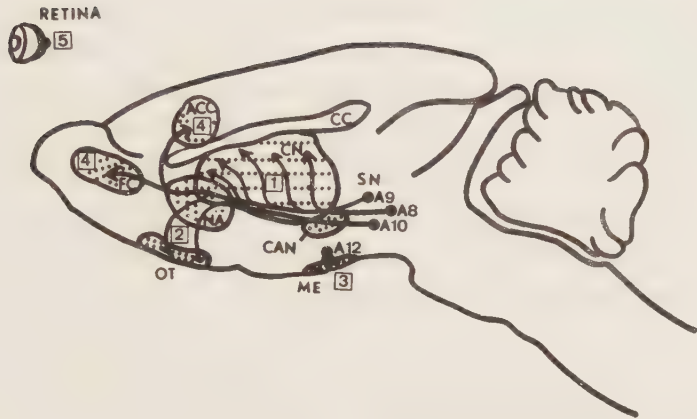


Figure 1

Les voies dopaminergiques dans le SNC (représentation schématique d'après les références 92 et 93).

Légende :

SN		<i>substantia nigra</i>
CN		<i>nucleus caudatus (striatum)</i>
CAN		<i>nucleus amygdaloideus centralis</i>
OT		<i>tuberculum olfactorium</i>
NA		<i>nucleus accumbens</i>
ACC		<i>cortex cingularis anterior</i>
FC		<i>cortex frontalis</i>
ME		<i>tuber cinereum (éminence médiane)</i>
CC		<i>corpus callosum</i>

à la substance P (34), aux opiacés (35,36) et finalement les récepteurs dopaminergiques (20,21,22,37).

Dans la rétine les récepteurs gabaergiques (38), cholinergiques muscariniques (39) ont été caractérisés par la méthode de binding, mais aucune étude de ce type n'avait été faite jusqu'à présent pour les récepteurs à la dopamine. La caractérisation et l'étude des propriétés pharmacologiques du récepteur dopaminergique dans la rétine de mammifère par la méthode de binding ont fait l'objet de cette thèse.

B. VOIES DOPAMINERGIQUES

Cinq voies dopaminergiques ont été décrites dans le système nerveux central (40,41) (Fig. 1) :

1. la voie nigro-striatale.-

Les corps cellulaires se trouvent dans la *pars compacta* de la *substantia nigra* (groupes A8 et A9). Les axones se terminent dans le *globus pallidum* et le *striatum*. Cette voie est en relation avec la motricité extra-pyramidale (42).

2. la voie méso-limbique.-

Les neurones de cette voie ont leur corps cellulaire disposé médialement par rapport à la *substantia nigra* et entourent le *nucleus interpeduncularis* (zone A10). Ils correspondent macroscopiquement au *nucleus linearis caudalis*, *nucleus parabrachialis pigmentosus* et le *nucleus paranigralis*. Les axones se terminent dans les régions du système limbique sous-cortical, en particulier le *nucleus accumbens* et le *tuberculum olfactorium*. Cette voie ainsi que la voie méso-corticale pourraient constituer le *substratum* anatomique de l'effet antipsychotique des neuroleptiques (42).

3. la voie méso-corticale.-

Les corps cellulaires se trouvent dans la *substantia nigra* (A9) et dans la zone A10. Les axones se terminant dans le cortex frontal sont issus des neurones ayant leurs corps cellulaires dans la zone A10 et ceux qui se terminent dans le cortex *cingularis* sont issus des neurones de la zone A9.

4. la voie tubéro-infundibulaire.-

Il existe deux voies courtes constituées par des neurones de type Golgi II dans l'hypothalamus et dans la rétine. Au niveau hypothalamique les corps cellulaires se trouvent dans le *nucleus arcuatus* et se terminent dans la couche extrême de l'éminence médiane constituant ainsi le faisceau tubéro-infundibulaire. De plus, des récepteurs dopaminergiques ont été mis en évidence dans l'hypophyse antérieure par la méthode de binding (43,44) et dans l'hypophyse postérieure par la mesure de l'activité de l'adénylate cyclase sensible à la dopamine (12). Ces données permettent de penser qu'il existe également une transmission dopaminergique d'un type particulier (via le système porte) entre l'hypothalamus et l'hypophyse (42,45). Cette voie serait en relation avec la régulation de la sécrétion de prolactine (45) et d'oxytocine (46).

5. les voies dopaminergiques dans la rétine (41,47,48).-

A ce niveau les corps cellulaires des neurones dopaminergiques se trouvent dans la partie la plus interne de la couche nucléaire interne, parmi les cellules amacrines. On trouve quelques cellules dopaminergiques appartenant à d'autres groupes morphologiques telles que les cellules interplexiformes, les cellules ganglionnaires (alloganglionnaires) et les cellules hermites dans la plexiforme interne. Tous les

axones de ces neurones innervent ensuite la couche plexiforme interne où ils se terminent en une à trois sous-couches selon les espèces. Il n'y a pas d'axones dopaminergiques au niveau du nerf optique, ce qui indique que les neurones dopaminergiques sont exclusivement intra-rétiniens. Une fonction définitive n'a pas été attribuée aux voies dopaminergiques rétiniennes. Toutefois, elles semblent impliquées dans les mécanismes d'adaptation lumière-obscurité, avec probablement une fonction inhibitrice (49).

II. LA RETINE

D'un point de vue morphologique et fonctionnel la rétine peut être considérée comme faisant partie du SNC. De plus, embryologiquement, elle provient d'une excroissance du diencéphale et à l'exception des photorécepteurs, elle peut être considérée comme de la matière grise (50). La rétine représente donc un modèle simple et accessible pour l'étude de la neurotransmission dans le SNC.

A. ORGANISATION DE LA RETINE (47,50,51)

La rétine est constituée essentiellement de cinq types de neurones et d'un type de cellule gliale (fibres de Müller). Les corps cellulaires sont disposés en trois couches nucléaires (nucléaire interne, externe et cellules ganglionnaires) ; les synapses s'établissent entre les différents types de cellules au niveau des deux couches plexiformes. Les corps cellulaires des photorécepteurs se trouvent dans la nucléaire externe. Au niveau de la plexiforme externe ces cellules établissent des synapses avec des cellules bipolaires et horizontales. Les cellules amacrines, parmi lesquelles se trouvent la plupart des corps cellulaires des neurones dopaminergiques (voir plus haut), se trouvent dans la partie la plus interne de la couche nucléaire interne. Les cellules neurogliales de Müller enfin, s'étendent radialement à travers les différentes couches rétinienne, donc parallèlement aux photorécepteurs et aux cellules bipolaires (Fig. 2).

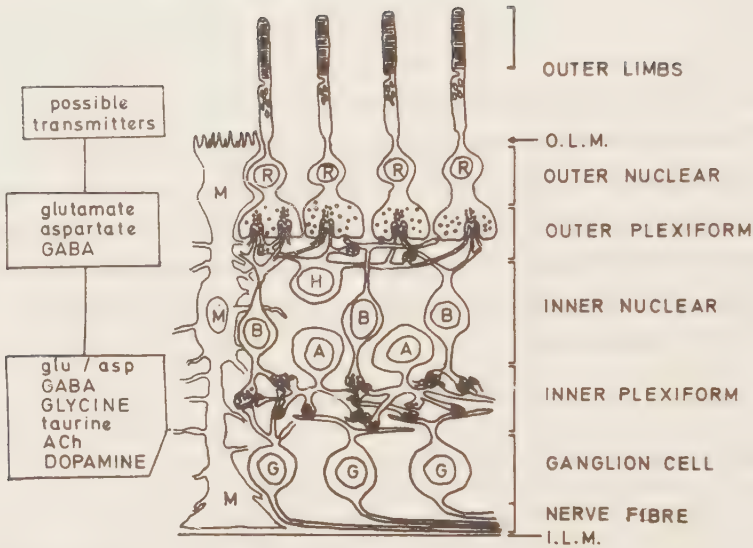


Figure 2

Organisation et neurotransmetteurs de la rétine de vertébré
(représentation schématique d'après les références 50 et 94).

Au niveau de la couche plexiforme externe, les pédicules cellulaires des photorécepteurs (R) font une synapse avec des processus provenant des cellules bipolaires (B) et horizontales (H). Au niveau de la couche plexiforme interne les terminaisons des cellules bipolaires entrent en contact avec un dendrite d'une cellule ganglionnaire (G) et un ou deux processus de cellules amacrines (A). Les cellules gliales de Müller (M) s'étendent, de la membrane limitante externe (OLM) à la membrane limitante interne (ILM), parallèlement aux photorécepteurs et aux cellules bipolaires.

B. NEUROTRANSMETTEURS DE LA RETINE (50)

Outre les amines biogènes qui seront traitées plus loin, plusieurs autres substances remplissent l'un ou l'autre des critères de neurotransmetteur au niveau rétinien. Il s'agit de l'acétylcholine au niveau des cellules amacrines, de l'acide glutamique et de l'acide aspartique (photorécepteurs et cellules bipolaires) et des acides aminés à rôle inhibiteur tels que le GABA, la glycine et la taurine au niveau des cellules horizontales et amacrines (Fig. 2).

C. AMINES BIOGENES DE LA RETINE (51)

Par la méthode d'histofluorescence (5,41) la présence de catécholamines au niveau de couches bien précises de la rétine a été démontrée. Il est possible de différencier histochimiquement les catécholamines entre elles (6). Il a été ainsi démontré que les neurones marqués par histofluorescence étaient exclusivement dopaminergiques. Cette donnée histochimique est corroborée par des évidences chimiques et enzymatiques. En effet, la concentration de dopamine est de 1-2 $\mu\text{g/g}$ chez le lapin (52), et même davantage chez d'autres espèces (53). Par contre, la noradrénaline n'est présente qu'en quantité minime, résultant probablement d'une contamination provenant de la choroïde (51). En ce qui concerne la 5-hydroxy-tryptamine (serotonine), seulement quelques dixièmes de microgramme ont été mis en évidence (51). De plus, aucune preuve histochimique n'existe quant à la localisation de neurones sérotonergiques au niveau rétinien (51). Finalement on a identifié les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de la dopamine, à savoir la tyrosine hydroxylase (54) et la monoamine-oxydase (55).

En conclusion, parmi les amines biogènes (dopamine, noradrénaline et sérotonine) identifiées comme neurotransmetteurs dans différentes parties du SNC, seule la dopamine joue ce rôle au niveau rétinien.

III. LA LIAISON SPECIFIQUE DU ³H-SPIROPERIDOL DANS LA RETINE MAMMIFERE

A. INTRODUCTION

Le concept de récepteur aux neurotransmetteurs et/ou aux hormones, implique l'existence de deux composants : un site de reconnaissance où s'établit la liaison et un site effecteur, qui traduit la reconnaissance du transmetteur en une action au niveau cellulaire. En ce qui concerne les neurotransmetteurs, cette action peut résulter en un changement de la perméabilité ionique, ou encore en une accumulation de nucléotides cycliques, qui à leur tour sont responsables de l'effet biologique. Les études de binding interrogent le site de reconnaissance, ses interactions avec différentes substances, et sa régulation (26).

1. Généralités sur la méthode de binding.-

Le marquage des récepteurs se fait généralement en incubant soit le neurotransmetteur marqué par un radioisotope, soit des agonistes ou des antagonistes marqués, avec des homogénats du tissu que l'on veut étudier. Toutefois, la plupart des radioligands utilisés, se lient aux membranes biologiques de façon relativement peu spécifique, soit par attraction ionique, soit par interaction hydrophobe et/ou mise en jeu de forces de Van der Waals (26). La densité de récepteurs pour les neurotransmetteurs dans le SNC étant de l'ordre de $10-500 \text{ fmoles.mg.prot}^{-1}$ et la concentration des sites non spécifiques étant virtuellement infinie, il est pratiquement impossible, sans précautions adéquates, de distinguer ce qui est lié de façon spécifique de ce qui l'est non

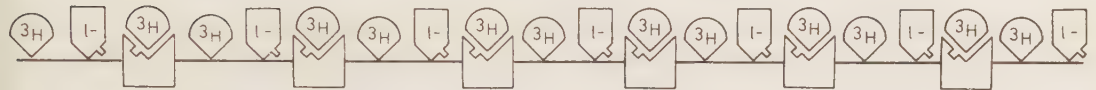
spécifiquement. Ce problème peut être en partie résolu en utilisant des ligands avec une très haute affinité pour le récepteur et possédant une radioactivité spécifique élevée (10-30 Ci/mmmole). On peut ainsi utiliser de très faibles concentrations de ligand (10^{-10} - 10^{-8} M) et réduire la quantité liée de façon non spécifique. On peut encore améliorer la qualité des résultats à l'aide de la technique de la filtration rapide (voir détails dans "MATÉRIEL ET MÉTHODES"), qui permet de "laver" les membranes sur un filtre sous une pression réduite. On éliminera ainsi encore une quantité appréciable de radioactivité liée non spécifiquement car cette liaison est beaucoup plus lâche que la liaison spécifique. On utilise enfin, en complément à ces méthodes de séparation physique, le principe de la dilution isotopique, pour évaluer de façon quantitativement précise la liaison spécifique. Pour ce faire, on ajoute dans certains échantillons un large excès (100-1000 fois la valeur de la constante de dissociation à l'équilibre du complexe ligand-récepteur) de ligand non marqué, ce qui entraîne une disparition du marquage des récepteurs spécifiques alors que les sites à affinité plus faible (non spécifiques) restent marqués de la même façon (Fig. 3). Dans ces conditions on évaluera la part de radioactivité qui est due à la liaison non-spécifique (NSB). Dans des échantillons en parallèle on n'ajoutera pas cet excès de ligand froid, ce qui nous donnera une estimation de la radioactivité totale (TB). En soustrayant ensuite du TB le NSB on obtiendra la radioactivité due à la liaison spécifique (SB) (Fig. 3).

Une fois que la liaison spécifique a été définie par ces

Figure 3

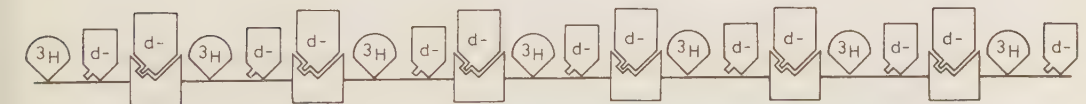
Principe de la dilution isotopique. Exemple représentant l'application du principe au marquage des récepteurs dopaminergiques par le ^3H -spiropéridol (page 19).

A. Conditions : 25 μl ^3H -spiropéridol 0-25 nM
25 μl 1-butaclamol 10^{-6} M
450 μl homogénat



Résultat : 1300 cpm = liaison totale (TB)

B. Conditions : 25 μl ^3H -spiropéridol 0.25 nM
25 μl d-butaclamol 10^{-6} M
450 μl homogénat



Résultat : 700 cpm = liaison non spécifique (NSB)

C. Liaison stéréospécifique (SB) = TB (1300 cpm) - NSB (700 cpm) = 600 cpm.

Légende :

$\textcircled{^3\text{H}}$ = ^3H -spiropéridol (100 cpm)

$\textcircled{1-}$ = 1-butaclamol

$\textcircled{\text{d-}}$ = d-butaclamol

méthodes, il faut remplir certains critères précis visant à identifier et à caractériser un récepteur (56).

2. Critères d'identification d'un récepteur.-

- a. saturabilité : le nombre de sites non spécifiques est virtuellement infini, pour un nombre fini de récepteurs spécifiques. En incubant par conséquent, l'homogénat avec des concentrations croissantes de ligand marqué, on atteint, à partir d'une certaine concentration, une saturation de la liaison spécifique, alors que le NSB croît linéairement. Pour satisfaire un des critères d'identification, il faut que la concentration de saturation soit de l'ordre de la nanomolaire et que le nombre de sites spécifiques calculés se situe entre 10 et 500 fmoles.mg.prot⁻¹.
- b. stéréospécificité : il s'agit probablement du critère le plus important à satisfaire. Cette stéréospécificité peut être démontrée par des isomères du radioligand ou ceux de substances non marquées utilisées comme agents déplaçants (courbes de déplacement).
- c. sensibilité au pH et à la température : la liaison spécifique se fait à un pH et à une température optimaux elle est par conséquent affectée par toute variation de ces paramètres, contrairement à la liaison non spécifique.
- d. linéarité avec la concentration de protéines : la liaison spécifique doit augmenter linéairement avec la quantité de tissu présent dans l'homogénat, donc avec la concentration de récepteurs.
- e. pharmacologie : l'identification et la caractérisation d'un récepteur se font principalement sur la base de sa pharmacologie. Ceci signifie que des drogues qui agissent

in vivo en mimant ou en bloquant les effets d'un neurotransmetteur, doivent entrer en compétition pour la liaison spécifique avec le ligand marqué, à faible concentration alors que des substances inefficaces *in vivo* doivent déplacer la radioactivité seulement à de très hautes concentrations.

Nous nous sommes donc proposés de définir la liaison spécifique et de remplir les critères d'identification et de caractérisation sus-mentionnés pour le récepteur dopaminergique dans la rétine de bovidé (57). Lors d'études préliminaires, on a pu mettre en évidence une liaison saturable et spécifique de ^3H -dopamine et du neuroleptique ^3H -spiropéridol à des homogénats de rétine de lapin (58) et de bovidé (59).

B. MATERIEL ET METHODES

1. Préparation du tissu.-

Les yeux de bovidés (âge : entre 1 et 3 ans) sont prélevés aux abattoirs de la Ville de Genève, au maximum dix minutes après la mort de l'animal, et immédiatement placés dans la glace. Les globes oculaires sont ouverts par une incision coronaire au niveau du limbe, vidés du cristallin et du corps vitré, puis complètement retournés. La rétine est séparée de la sclère à l'aide d'un pinceau, ramenée à son origine au nerf optique et coupée à ce niveau. Toute l'opération se fait dans la chambre froide à 4° . Les rétines sont ensuite homogénéisées dans 50 volumes d'un tampon Tris-HCl 50 mM glacé ayant un pH de 7.7 à 25° . L'homogénéisation se fait par un homogénéisateur Polytron PT-10 (Brinkmann)

pendant 30 secondes en position 6 sur une échelle de 10. Des temps ou des vitesses d'homogénéisation plus élevés conduisent à une perte de protéines lors de la filtration. L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à $50.000 \times g$ dans une ultracentrifugeuse Sorvall OTD-2 (17.000 rpm, rotor SW-27) à 4° . Le surnageant est éliminé, le culot homogénéisé et centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions. Cette opération a pour but de débarrasser les membranes de la dopamine endogène, de façon à éliminer toute compétition avec le ligand marqué pour les sites de liaison spécifique. Le dernier culot est homogénéisé dans 20 volumes d'un tampon Tris-HCl 50 mM glacé ayant un pH de 7.6 à 25° et contenant 0.1 % d'acide ascorbique comme anti-oxydant, 10 μ M de pargyline, un inhibiteur de la monoamine oxydase et les ions suivants : 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 et 1 mM de MgCl_2 . Toutes les manipulations se font à 4° . La concentration de protéines est mesurée pour chaque expérience (60).

2. Expériences biologiques.-

Principe général : une quantité fixe (450 μ l) d'homogénat, correspondant à 15-20 mg de poids humide de tissu original, est incubée pendant 15 minutes avec 25 μ l d'une solution de différentes drogues, selon l'expérience, et 25 μ l de ^3H -spiropéridol. Il a en effet été démontré dans différentes parties du SNC (noyau caudé, cortex frontal, hypophyse) que le spiropéridol, un neuroleptique, est un ligand adéquat pour caractériser les récepteurs à la dopamine (43,61,62). Il présente, dans ces parties du SNC, une grande affinité pour le récepteur dopaminergique (K_D 0.2 - 1 nM)

et son activité spécifique est très élevée (25 Ci/mmmole).

Le temps d'incubation de 15 minutes a été choisi sur la base d'expériences en fonction du temps qui montrent qu'après 10 minutes la liaison du ^3H -spiropéridol avec les membranes de rétine atteint un plateau (Fig. 4).

Toutes les solutions sont préparées le jour même de l'expérience dans 0.1 % d'acide ascorbique et, pour la solution tritiée, dans l'éthanol à 25 %. A la fin de l'incubation l'homogénat est dilué avec 2 ml de tampon Tris-HCl glacé 50 mM pH 7.7 à 25°, puis filtré sous vide sur des filtres en fibre de verre GF/B Whatman disposés sur une rampe Millipore. La dilution avec le tampon permet l'étalement uniforme de l'homogénat sur le filtre. Les filtres sont ensuite lavés par 2 x 5 ml du même tampon glacé utilisé pour la dilution. La filtration et le lavage durent au maximum 15 sec. Ceci est un point crucial, car des temps plus longs pourraient favoriser le passage de molécules de ligand marqué fixées sur les membranes, dans le liquide de lavage et fausser de ce fait l'évaluation de la radioactivité spécifiquement liée. Les filtres sont ensuite séchés pendant 10 minutes sous vide, puis déposés dans des flacons dans lesquels on ajoute 10 ml de liquide à scintillation à 4° (Toluène-POPOP-PPO). Les flacons sont ensuite placés à 4° pendant une heure pour équilibrer la radioactivité entre les filtres et le liquide à scintillation, puis comptés, après agitation, dans un spectrophotomètre Beckmann LS-355 (rendement de 45-49 % pour le ^3H).

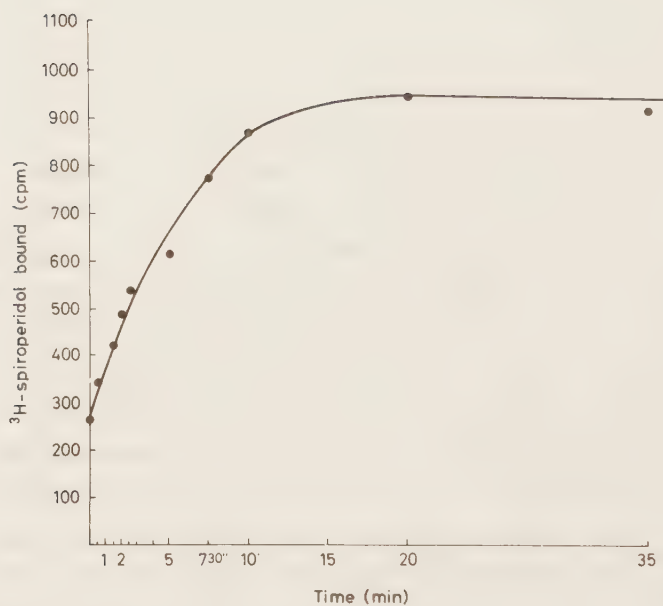


Figure 4

Liaison du ^3H -spiropéridol à des homogénats de rétine en fonction du temps d'incubation.

Une quantité fixe de tissu (20 mg) est incubée avec 25 μl de ^3H -spiropéridol 0.25 nM pendant des périodes croissantes de temps. Les résultats représentent la liaison totale (TB).

Légende :

- . ordonnée ^3H -spiropéridol lié (cpm)
- . abscisse temps d'incubation (minutes).

C. RESULTATS

1. Caractérisation du récepteur.-

- a. Stéreo-spécificité : pour ces expériences une concentration fixe de ^3H -spiroperidol (0.25 nM) est incubée avec l'homogénat en présence de concentrations croissantes de deux classes de neuroleptiques existant sous la forme de stéréoisomères. Les isomères testés sont le d- et l-butacclamol (pentacycliques), et les thioxanthènes cis- et trans-flupenthixol et clopenthixol. En clinique (63) et comme inhibiteurs de l'adenylate-cyclase sensible à la dopamine (64,65) (Fig. 5), seuls le d-butacclamol et les isomères cis- des thioxanthènes sont actifs. Cette stéréospécificité se retrouve dans les courbes de déplacement comme le montrent les Figures 6 et 7. La concentration qui déplace 50 % de la radioactivité spécifiquement liée (IC_{50}) est 100 x plus faible pour les isomères cis- des thioxanthènes (Fig. 6). En ce qui concerne le butacclamol cette stéréospécificité est encore plus marquée, l'isomère d- étant 1000 x plus puissant que le l-. De plus, la courbe de déplacement engendrée par le d-butacclamol présente deux composantes correspondant à une haute et une faible affinité respectivement, avec un point de changement de pente autour de 10^{-6} M (Fig. 7). Cette concentration correspond au début du déplacement engendré par le l-butacclamol. On peut en déduire qu'à partir de 10^{-6} M le d-butacclamol déplace des molécules de ligand marqué qui sont fixées de façon non spécifique. C'est pour cette raison que 10^{-6} M a été choisi pour évaluer le NSB, car selon le principe même de la dilution isotopique (cf. "GENERALITES",

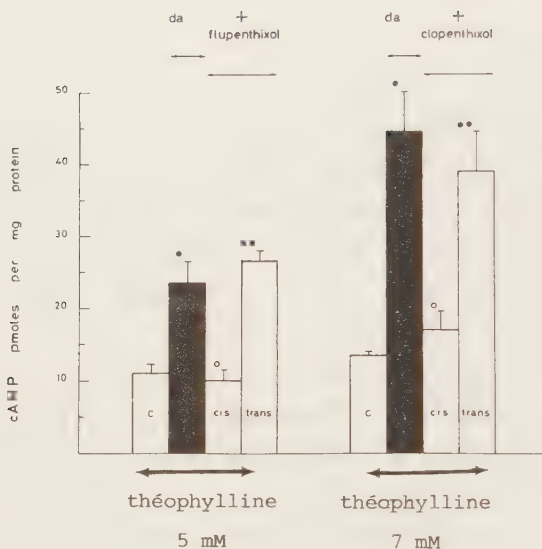


Figure 5

Interaction stéréospécifique des isomères des thioxanthènes avec l'adénylate cyclase sensible à la dopamine (référence 65).

L'effet des isomères *cis*- et *trans*- du flupenthixol et du clopenthixol sur l'accumulation d'AMP cyclique induite par la dopamine a été mesurée dans des rétines intactes de lapin.

- * significativement différent du contrôle ($p < 0.001$)
- ** significativement différent du contrôle ($p < 0.001$) et non significativement différent de la dopamine ($p > 0.6$)
- non significativement différent du contrôle ($p > 0.5$) et significativement différent de la dopamine ($p < 0.001$).

Légende :

. ordonnée picomoles d'AMP-cyclique formées par mg de protéines

. abscisse



= contrôle



= dopamine $10^{-4}M$



= dopamine $10^{-4}M$ + *cis*-thioxanthène $10^{-4}M$



= dopamine $10^{-4}M$ + *trans*-thioxanthène $10^{-4}M$.

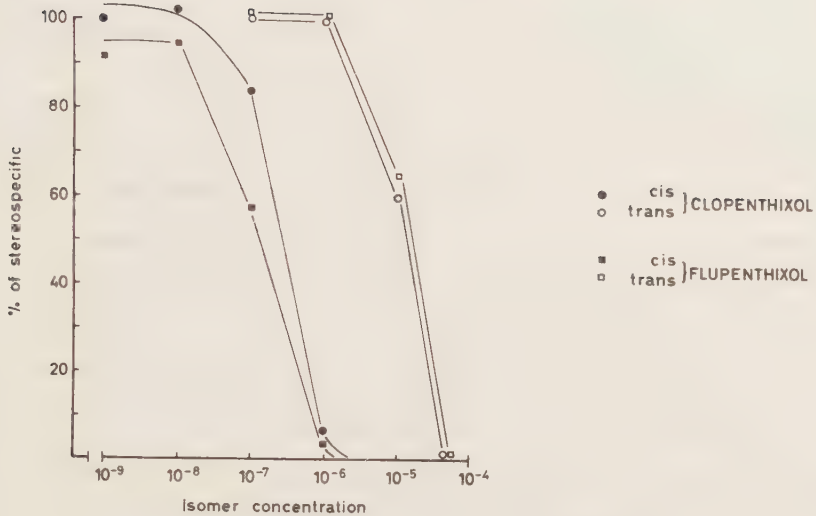


Figure 6

Interaction stéréospécifique des isomères des thioxanthènes avec la liaison du ^3H -spiropéridol à des homogénats de rétine de bovidé.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison stéréospécifique (voir dans la partie "RESULTATS", p. 19). Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie "MATÉRIEL ET MÉTHODES".

Légende :

- . ordonnée % de la liaison stéréospécifique
- . abscisse concentration des isomères (M).

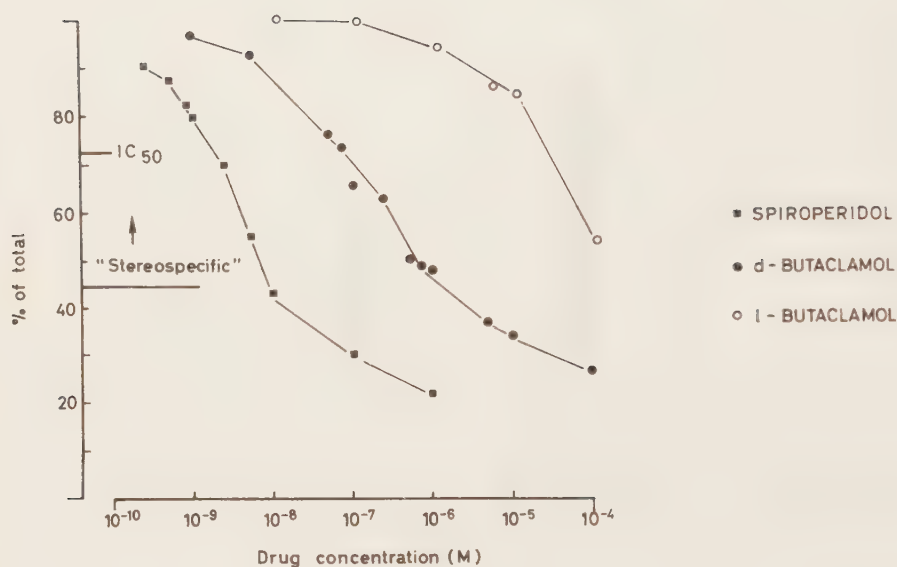


Figure 7

Courbe de déplacement du ^3H -spiropéridol engendrée par des concentrations croissantes de spiropéridol non marqué et des isomères d- et l- du butaclamol. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison totale. La portion stéréospécifique de la liaison est définie par référence à des tubes contenant 10^{-6} M de d-butacclamol (voir la partie "RESULTATS" p. 19). Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie "MATÉRIEL ET MÉTHODES".

Légende :

- . ordonnée % de la liaison totale
- . abscisse concentration de spiropéridol et de d- et l-butacclamol ajoutée (M).

Fig. 3), tous les sites spécifiques sont occupés à cette concentration par le ligand non marqué et de ce fait la radioactivité mesurée correspond à la liaison non spécifique. Dans ces conditions le NSB représente 50-60 % du TB.

- b. saturabilité : on a incubé des concentrations croissantes de ^3H -spiroperidol (de 0.025 à 3.5 nM) avec des homogénats de rétine selon le protocole décrit dans la partie "MATÉRIEL ET MÉTHODES". La liaison spécifique (SB) a été définie comme étant la différence entre la liaison totale (TB), c'est-à-dire la radioactivité mesurée en présence de 10^{-6} M de l-butaclamol (cf. paragraphe précédent) et la liaison non-spécifique (NSB), c'est-à-dire la radioactivité mesurée en présence de 10^{-6} M de d-butaclamol. La figure 8A montre que le NSB augmente de façon linéaire alors que le SB est saturable à partir de 2 nM (Fig. 8B). Une analyse de Scatchard de la courbe de saturation démontre une constante d'affinité à l'équilibre (K_D) de 1.35 nM et un nombre de sites spécifiques de 107 fmoles.mg de prot. $^{-1}$ (Fig. 8C).
- c. influence de la température : on a incubé pour ces expériences 0.25 nM de ^3H -spiroperidol pendant 15 minutes à 0° , 22° et 37° . La liaison spécifique est abolie à 2° et diminuée de 30 % à 22° , alors que le NSB est virtuellement insensible aux changements de température (Table I). Une préincubation de 5' à 90° abolit totalement le SB, sans changer le NSB.
- d. influence du pH : ces expériences ont été conduites dans des conditions expérimentales "standard", seul le pH du milieu d'incubation a varié. La liaison spécifique est très sensible aux variations de pH, contrairement au NSB, (Table II). Le SB est optimal à pH 7.1 à 37° .

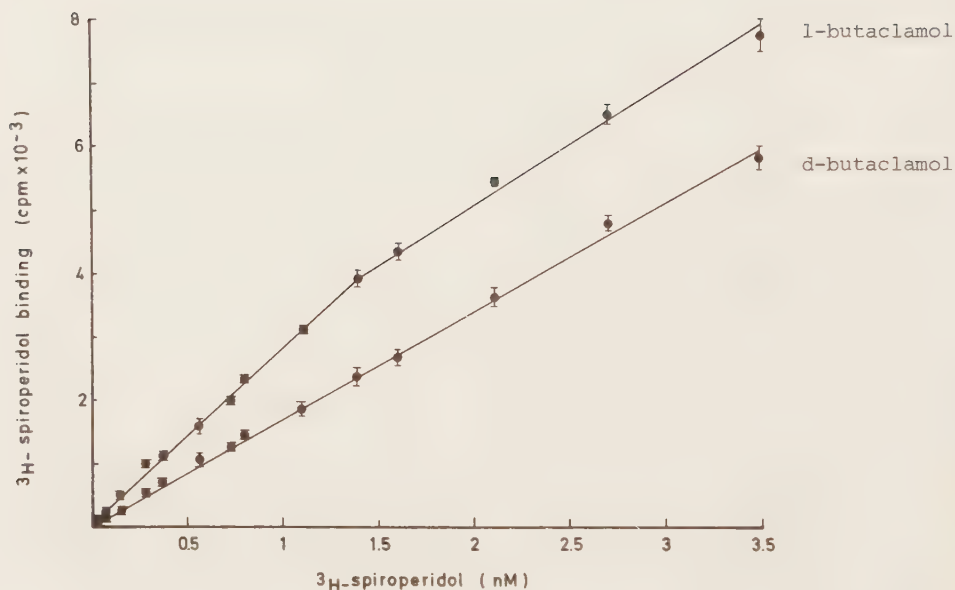


Figure 8A

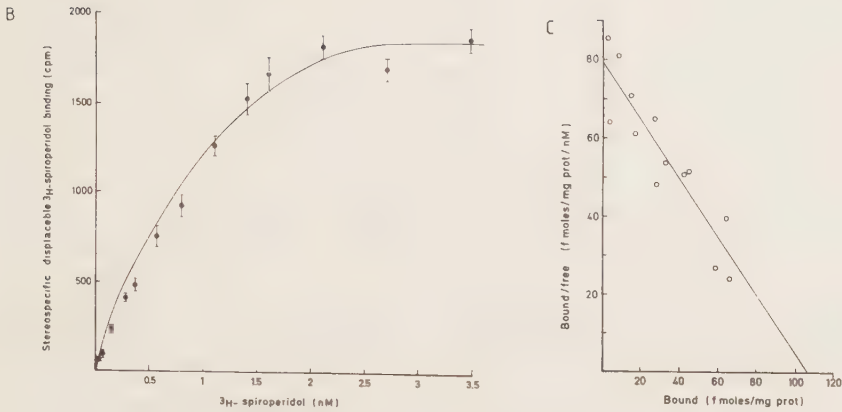
Liaison du ^3H -spiropéridol à des homogénats de rétine de bovidé.

Une quantité fixe de tissu (20 mg) et des concentrations croissantes de ^3H -spiropéridol sont incubées à 37° pendant 15 minutes. Pour chaque concentration la liaison totale (c'est-à-dire la quantité de radioactivité liée en présence de 10^{-6} M de l-butacclamol) et la liaison non spécifique (c'est-à-dire la quantité de radioactivité liée en présence de 10^{-6} M de d-butacclamol) est mesurée.

Légende :

. ordonnée ^3H -spiropéridol lié (cpm)

. abscisse concentration de ^3H -spiropéridol ajoutée (nM).



Figures 8B et 8C

Fig. 8B : Pour chaque concentration la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique (cf. Fig. 8A) est calculée. Cette différence représente la radioactivité liée stéréospécifiquement.

Fig. 8C : Une analyse de Scatchard de la courbe de saturation (Fig. 8B) donne une constante de dissociation à l'équilibre du complexe ligand-récepteur (K_D) de 1.35 nM et une densité de sites stéréospécifiques de liaison de $107 \text{ fmoles.mg protéines}^{-1}$ ($r = 0.91$; $p < 0.001$).

Légende :

8B : ordonnée liaison stéréospécifique (cpm)
abscisse concentration de ^3H -spiropéridol ajoutée (nM)

8C : ordonnée femtomoles de ^3H -spiropéridol liées / mg de prot.
concentration de ^3H -spiropéridol ajoutée (nM)
abscisse femtomoles de ^3H -spiropéridol liées / mg de prot.

TABLE I

Influence de la température sur la liaison stéréospécifique
du ^3H -spiropéridol

T°	TB ^{a)} (cpm)	NSB ^{b)} (cpm)	SSB ^{c)} (cpm)	$\frac{\text{SSB}}{\text{TB}} \times 100$
2 ^o	417 $\pm$ 8	441 $\pm$ 16	-	-
22 ^o	649 $\pm$ 31	483 $\pm$ 21	166 $\pm$ 21	25.6
37 ^o	943 $\pm$ 13	532 $\pm$ 11	410 $\pm$ 11	43.5

Une quantité fixe de tissu (20 mg) et 25 μl de ^3H -spiropéridol 0.25 nM sont incubés pendant 15 minutes à des températures différentes. Le SSB est défini par référence à des tubes contenant 10^{-6} M de d-butaclamol (voir dans la partie "RESULTATS", p. 19).

a) liaison totale b) liaison non spécifique c) liaison stéréospécifique

TABLE II

Influence du pH sur la liaison stéréospécifique du ^3H -spiropéridol

pH (à 37°)	TB ^{a)} (cpm)	NSB ^{b)} (cpm)	SSB ^{c)} (cpm)	$\frac{\text{SSB}}{\text{TB}} \times 100$
1.5	331 $\pm$ 3	338 $\pm$ 12	-	-
5.5	515 $\pm$ 27	476 $\pm$ 11	39 $\pm$ 11	7.57
6.5	514 $\pm$ 18	423 $\pm$ 11	90 $\pm$ 11	17.6
7.1	978 $\pm$ 4	576 $\pm$ 27	400 $\pm$ 27	40.8
9.5	509 $\pm$ 49	370 $\pm$ 5	138 $\pm$ 62	27.1

Une quantité fixe de tissu (20 mg) et 25 μl de ^3H -spiropéridol sont incubés à 37° pendant 15 minutes à des pH différents. Le SSB est défini comme dans la Table I.

^{a)} liaison totale ^{b)} liaison non spécifique ^{c)} liaison stéréospécifique

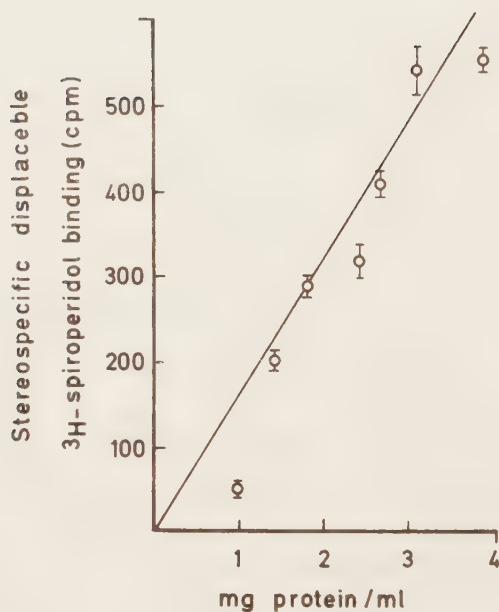


Figure 9

Linéarité de la liaison spécifique avec la concentration de protéines.

Des concentrations croissantes de tissu (1-4 mg protéines⁻¹) sont incubées avec 0.25 μ l de ³H-spiropéridol 0.25 nM à 37° pendant 15 minutes. La liaison stéréospécifique est définie par référence à des tubes contenant 10⁻⁶ M de d-butaclamol (voir dans la partie "RESULTATS" p. 19).

Légende :

. abscisse ³H-spiropéridol lié stéréospécifiquement (cpm)
. ordonnée mg de protéines . ml⁻¹

e. linéarité avec la concentration de protéines : la liaison spécifique augmente de façon linéaire en incubant une quantité fixe de ^3H -spiropéridol (0.25 nM) avec 0.5 à 3 mg/ml de protéines (Fig. 9). Au-delà de 4 mg/ml la filtration devient impossible. La plupart des expériences ont été effectuées entre 1.5 et 2.5 mg de protéines par ml.

2. Pharmacologie du récepteur à la dopamine dans la rétine.-

Ce type d'étude se fait en mettant en compétition pour le site de liaison spécifique, le ligand radiomarké (concentration fixe) avec la substance que l'on veut tester (concentrations croissantes). Ce type d'interaction donne lieu à des courbes de déplacement (Figs. 6,7,10,11). La puissance relative des différentes drogues est ensuite quantifiée par son IC_{50} , c'est-à-dire la concentration nécessaire pour déplacer 50 % de la radioactivité fixée stéréospécifiquement (Table III). Nous avons testé les classes suivantes de produits : des neuroleptiques, des agonistes dopaminergiques, des dérivés de l'ergot de seigle, des agonistes et des antagonistes d'autres amines biogènes, enfin des substances psychotropes sans relation avec le récepteur dopaminergique.

a. neuroleptiques : parmi les neuroleptiques testés, le pimozide, l'halopéridol, le d-butaclamol et le spiropéridol se sont révélés les plus puissants (IC_{50} compris entre 1.8 et 24 nM) (Table III). Les deux premiers sont considérés comme des antagonistes dopaminergiques purs. Le dompéridone, un antagoniste dopaminergique ne passant pas la barrière hémato-encéphalique est également parmi les plus puissants ($\text{IC}_{50} = 56 \text{ nM}$) (Légende Table III).

TABLE III

Inhibition de la liaison du ^3H -spiropéridol par différentes substances.

<u>SUBSTANCES</u>	IC ₅₀ (nM)
<u>A. Neuroleptiques</u>	
spiropéridol	1.8
pimozide	16.8
halopéridol	21.3
d-butaclamol	24
cis-flupenthixol	101.6
fluphénazine	175.8
clozapine	206
chlorpromazine	239
pipampérone	268.7
thioridazine	290
trans-flupenthixol	13.000
sulpiride	20.000
l-butaclamol	28.500
<u>B. Agonistes dopaminergiques</u>	
apomorphine	81.7
n-methyl-dopamine (épinine)	4.700
ADTN *	4.775
dopamine	5.333
<u>C. Dérivés de l'ergot de seigle</u>	
lisuride	12
d-LSD	340

* 2-amino-6,7-dihydroxytetrahydronaphtalène

(suite voir page suivante)

(Table III, suite)

D. Substances inactives

5-HT(sérotonine), méthysergide, amphétamine, 6-OH-dopamine, α -méthyldopa, amantadine, harmaline, propranolol, adrénaline, nor- adrénaline, isoprotérénol, phentolamine, atropine, carbachol, morphine.	} > 45.000
--	------------

La puissance des différentes substances sur la liaison stéréospécifique du ^3H -spiropéridol est déterminée dans les conditions expérimentales décrites dans la partie "MATÉRIEL ET MÉTHODES". L' IC_{50} représente la concentration de chaque substance nécessaire pour inhiber de 50 % la liaison stéréospécifique du ^3H -spiropéridol.

Le dompéridone, un antagoniste dopaminergique ne passant pas la barrière hémato-encéphalique présente un IC_{50} de 56.5 nM.

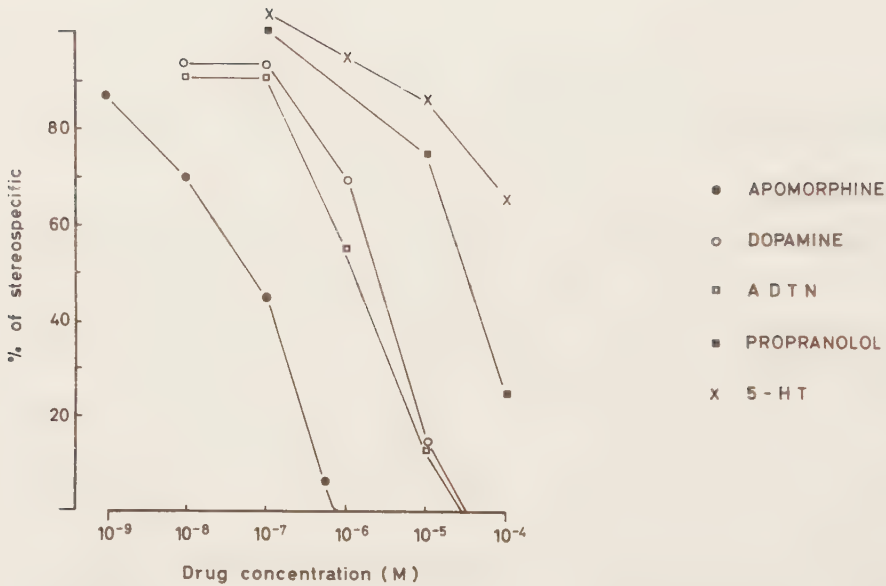


Figure 10

Courbes de déplacement du ³H-spiropéridol engendrées par la 5HT (sérotonine), le propranolol et des agonistes dopaminergiques.

Ces résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison stéréospécifique (voir dans la partie "RESULTATS", p. 19). Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie "MATERIEL ET METHODES".

Légende :

- . ordonnée % de la liaison stéréospécifique
- . abscisse concentration des substances (M).

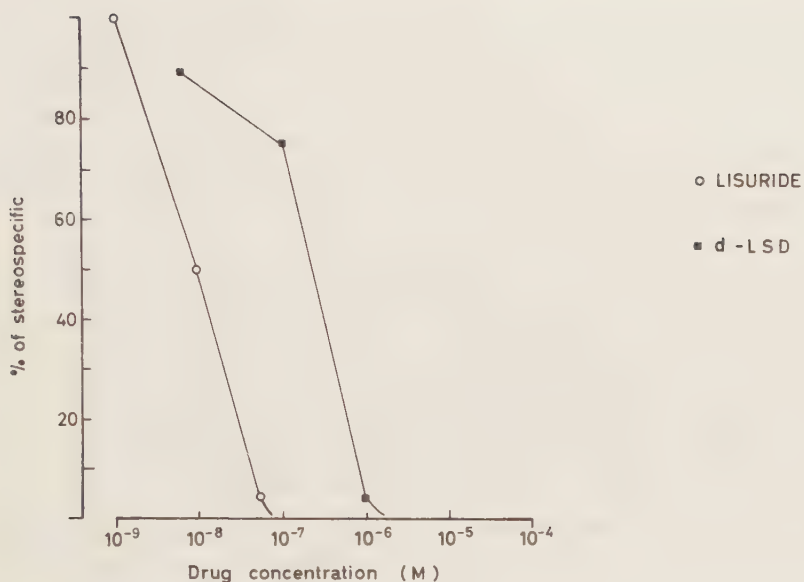


Figure 11

Courbes de déplacement du ^3H -spiropéridol engendrées par deux dérivés de l'ergot de seigle.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison stéréospécifique (voir dans la partie "RESULTATS" p. 19). Les conditions expérimentales sont décrites dans la partie "MATÉRIEL ET MÉTHODES".

Légende :

- . ordonnée % de la liaison stéréospécifique
- . abscisse concentration de dérivés de l'ergot de seigle (M).

Un deuxième groupe de neuroleptiques comprenant le cis-flupenthixol, la fluphenazine, la clozapine, la chlorpromazine, la thioridazine et le pipamperone, est d'un ordre de grandeur moins puissant (IC_{50} entre 101 et 290 nM) (Table III). Finalement, le sulpiride, les isomères trans-des thioxanthènes et l- du butaclamol sont inactifs (IC_{50} entre 13.000 et 28.500 nM).

- b. dopamine et agents dopaminomimétiques : pour compléter les critères de spécificité pour l'identification d'un récepteur, il faut que le neurotransmetteur physiologique déplace avec une puissance appréciable le ligand marqué.

Ceci a été démontré dans notre modèle. La dopamine en effet a un IC_{50} dans l'ordre de la concentration micromolaire. D'autres agonistes tels que l'ADTN et la n-méthyl dopamine (épinine) présentent des affinités semblables (Fig. 10 et Table III). L'apomorphine, un autre agoniste dopaminergique dans le SNC est environ 50 fois plus puissant (Fig. 10 et Table III).

- c. dérivés de l'ergot de seigle : les caractéristiques pharmacologiques de ces composés sont multiples. Ils présentent en effet des activités agonistes-antagonistes sérotonergiques et dopaminergiques dans des tests *in vivo* et *in vitro* (66,67,68,69,70,71,72,73,74). Dans notre modèle qui interroge uniquement le récepteur dopaminergique, il a été possible de distinguer clairement 3 types d'affinité pour ces composés. Le lisuride a une grande affinité ($IC_{50} = 12$ nM). Le d-LSD a une affinité intermédiaire ($IC_{50} = 340$ nM) (Fig. 11). Finalement, le méthysergide, un ergot avec une activité sérotonergique prédominante (75) a un $IC_{50} > 45.000$ nM (Table III).

d. autres amines biogènes : on a également testé la nor-adrénaline, l'adrénaline et les antagonistes des récepteurs β - et α -adrénergiques. Aucune de ces substances ne présente une affinité compatible avec une interaction spécifique avec le récepteur à la dopamine, les IC_{50} étant supérieurs à 45.000 nM (Table III). Il est important de noter que la 5-HT (sérotonine) est également très peu active ($IC_{50} > 45.000$ nM) (Table III - Fig. 10).

On a testé finalement une série de substances psychotropes n'ayant pas de relation directe connue avec les récepteurs dopaminergiques. Aucune n'a montré une affinité significative pour le récepteur étudié (Table III).

D. DISCUSSION

Dans la première partie de ce travail, nous avons caractérisé le récepteur dopaminergique dans la rétine de bovidé. Il a fallu tout d'abord répondre à une question fondamentale : "est-ce que la liaison du ligand marqué utilisé se fait avec une structure membranaire spécifique, à savoir un récepteur ?". Pour ce faire, plusieurs critères ont été remplis. La liaison spécifique (définie selon les critères exposés dans le paragraphe "MATÉRIEL ET MÉTHODES") du 3H -spiropéridol est saturable : les sites spécifiques sont donc en nombre défini, critère fondamental et caractéristique d'un récepteur spécifique. Au contraire, les sites non spécifiques ne seaturent pas, tout au moins aux concentrations nanomolaires utilisées pour l'étude du récepteur. Deuxièmement, la liaison est stéréospécifique. Cette stéréospécificité implique une liaison avec une structure spécialisée, très sensible aux changements conformationnels moléculaires. Enfin, le fait que la liaison augmente linéairement avec la concentration de protéines et qu'elle soit sensible au pH et

à la température, confirme la spécificité de l'interaction. A notre connaissance, il s'agit là de la première caractérisation des récepteurs à la dopamine dans la rétine, par la méthode de binding.

La deuxième partie de ce travail a consisté dans l'étude de la pharmacologie du récepteur que nous avons caractérisé.

En ce qui concerne les neuroleptiques, il existe des différences par rapport aux résultats obtenus dans des expériences comparables au niveau du striatum et surtout du cortex frontal (61,75,76). En effet, dans cette dernière partie du SNC, le pipamperone, la clozapine, la chlorpromazine et la fluphenazine sont plus puissants que l'halopéridol et le pimozide (74,75), alors que dans la rétine cette relation est inversée. Cette discrédance peut être expliquée sur la base de données anatomiques et pharmacologiques. Il a en effet été démontré qu'il existe une composante sérotonergique pour plusieurs neuroleptiques (75,77,78,79), en particulier pour le spiropéridol, la fluphénazine, la chlorpromazine, la clozapine et surtout le pipamperone, alors que l'halopéridol et le pimozide sont des bloqueurs exclusifs du récepteur dopaminergique. En conséquence, en utilisant comme radioligand le ^3H -spiropéridol on est en mesure de marquer les récepteurs sérotonergiques (tout au moins en partie) aussi bien que les récepteurs dopaminergiques, dans des aires du SNC où ces deux populations de récepteurs sont présentes. C'est le cas du striatum et plus encore du cortex frontal. Au niveau de l'hippocampe, structure virtuellement dépourvue de récepteurs dopaminergiques, le ^3H -spiropéridol marque uniquement les récepteurs sérotonergiques (80). Inversement, au niveau de la rétine, où le rôle de la sérotonine comme neurotransmetteur n'est pas établi, (cf. chapitres précédents) le ^3H -spiropéridol

ne peut marquer que les récepteurs dopaminergiques. Ces caractéristiques et ces différences se retrouvent dans la puissance relative des différents neuroleptiques pour le déplacement du ^3H -spiropéridol des sites de liaison spécifiques. En effet, dans les structures cérébrales comportant une population de récepteurs à la fois dopaminergique et sérotonergique, les neuroleptiques qui possèdent également une composante sérotonergique se révéleront plus puissants que ceux qui n'ont que la composante dopaminergique. Ceci n'est naturellement valable que lorsque les composantes dopaminergiques intrinsèques des substances testées sont comparables. Les neuroleptiques à composante mixte seront donc en mesure de déplacer la radio-activité spécifiquement liée aux deux populations de récepteurs. Au contraire, dans une structure du SNC comme la rétine, où l'amine biogène prédominante est la dopamine, seule l'affinité dopaminergique entrera en jeu. Pour confirmer cette hypothèse de travail nous avons comparé, dans des conditions expérimentales identiques, le comportement de l'halopéridol (purement dopaminergique) et de la fluphénazine (composante dopaminergique et sérotonergique) sur la liaison spécifique du ^3H -spiropéridol dans des homogénats de striatum, de cortex frontal et de rétine. Comme le montre la figure 12, la courbe de déplacement engendrée par l'halopéridol se déplace vers la droite, en passant de la rétine au striatum et au cortex frontal ; pour la fluphénazine l'effet inverse a lieu. On peut donc admettre qu'en utilisant le ^3H -spiropéridol comme radioligand, la puissance d'une substance dans le cortex frontal dépend essentiellement de sa composante sérotonergique alors que dans la rétine elle révélera sélectivement sa composante dopaminergique. Cette sélectivité de la rétine permet de classer les neuroleptiques d'après leur affinité pour le récepteur à

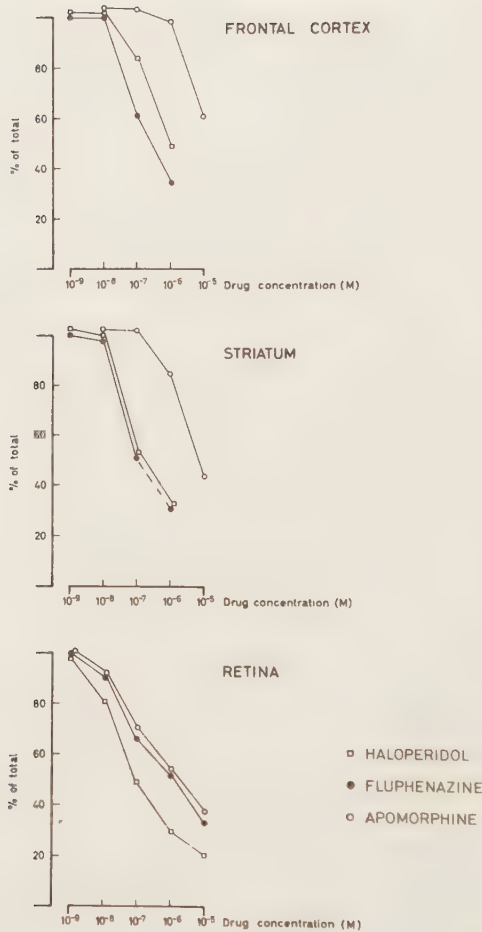


Figure 12

Courbe de déplacement du ^3H -spiropéridol engendrée par l'halopéridol, la fluphénazine et l'apomorphine dans des homogénats de rétine de bovidé, de striatum et de cortex frontal de rat. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison totale. Les conditions expérimentales décrites dans la partie "MATÉRIEL ET MÉTHODES" sont identiques dans les trois préparations.

Légende :

. ordonnée % de la liaison totale

la dopamine (Table III).

Ceci pourrait présenter un intérêt clinique, puisque seul le blocage des récepteurs dopaminergiques semble être impliqué dans le contrôle des symptômes de la schizophrénie (81).

En ce qui concerne les agonistes dopaminergiques, les IC_{50} de la dopamine, de l'épinépine et de l'ADTN sont dans l'ordre de la concentration micromolaire et se comparent avec des résultats obtenus dans le striatum (61-75). Cette valeur, à première vue élevée, est en fait compatible avec le modèle de récepteur à deux conformations (two-state receptor model) proposé par Snyder (22). Selon ce modèle, le récepteur à la dopamine peut se présenter sous deux conformations, l'une possédant une haute affinité pour les agonistes, l'autre une haute affinité pour les antagonistes. Ce type de récepteur a été démontré pour les opiacés (36), la glycine (82), la sérotonine (83). Par conséquent, en utilisant un antagoniste comme le 3H -spiropéridol on marquera le récepteur dans sa conformation antagoniste. Si le temps d'interconversion entre la conformation antagoniste et agoniste est suffisamment long *in vitro*, la puissance d'un agoniste pour déplacer un antagoniste marqué doit être nettement inférieure à celle d'un antagoniste dans les mêmes conditions. Les valeurs de IC_{50} des agonistes dopaminergiques comme agents déplaçants dans la rétine de mammifère sont donc compatibles avec un modèle de récepteur pouvant exister dans deux conformations interconvertibles.

L'apomorphine, quant à elle, a une affinité 50 fois supérieure aux autres agonistes (Fig. 10 - Table III). Cette haute affinité, qui se compare à celle des antagonistes dopaminergiques, (Table III) suggère la possibilité que l'apomorphine soit un agoniste-antagoniste mixte dans la rétine. Cette caractéristique

a été démontrée au niveau de récepteur dopaminergique de l'artère rénale de chien (84) et sur l'adénylate-cyclase sensible à la dopamine dans le striatum (85). Dans des expériences préliminaires de stimulation par la dopamine de l'adénylate-cyclase dans la rétine de bovidé, il nous a été possible de mettre en évidence une action antagoniste, bien que modérée, de l'apomorphine.

Finalement, la spécificité dopaminergique du binding du ^3H -spiropéridol dans la rétine est soulignée par la très faible affinité ($\text{IC}_{50} > 45.000 \text{ nM}$) (Table III) de la sérotonine et des agonistes et antagonistes α et β -adrénergiques ; ceci confirme des études pharmacologiques réalisées antérieurement sur l'adénylate-cyclase sensible à la dopamine dans le même tissu (86).

L'évaluation de l'affinité dopaminergique peut être étendue à d'autres substances psychotropes. Le lisuride, par exemple, est un dérivé de l'ergot de seigle dont l'affinité dopaminergique a été démontrée *in vivo* (87) et *in vitro* (88,89) et qui présente une haute affinité dans notre modèle ($\text{IC}_{50} = 12 \text{ nM}$) (Table III). Par comparaison, le d-LSD est environ 30 fois moins puissant (Fig. 11, Table III). Des résultats similaires ont été décrits pour ces deux substances lorsqu'elles ont été appliquées comme antagonistes de l'adénylate-cyclase sensible à la dopamine dans le striatum (89).

Finalement, il était intéressant de déterminer si le récepteur que nous avons caractérisé était en relation avec l'adénylate-cyclase sensible à la dopamine. En effet, une classification des récepteurs à la dopamine a été récemment proposée (15). Selon cette classification, deux types de récepteurs dopaminergiques existent (D_1 et D_2), l'un couplé à la cyclase (D_1), l'autre pas (D_2). Deux arguments pharmacologiques suggèrent l'existence d'un couplage

dans la rétine. Premièrement, le sulpiride est un neuroleptique qui, contrairement à tous les autres ne bloque pas l'accumulation d'AMP-cyclique induite par la dopamine dans le striatum et le nucleus accumbens (90) ; ceci a été également démontré dans la rétine (65). Il a été proposé que son action anti-psychotique était due au blocage des récepteurs dopaminergiques non couplés à la cyclase (91). Testé dans des courbes de déplacement du ^3H -spiropéridol, le sulpiride a une affinité très faible ($\text{IC}_{50} = 20.000 \text{ nM}$), un ordre de grandeur partagé par des substances agissant de façon non spécifique au niveau du récepteur (Table III). Deuxièmement, l'apomorphine se comporte comme un agoniste-antagoniste mixte dans des régions du SNC où les récepteurs à la dopamine sont couplés à la cyclase (15). Dans des courbes de déplacement, l'apomorphine a une puissance comparable à celle d'un antagoniste ($\text{IC}_{50} = 81 \text{ nM}$) (Table III). De plus, elle présente une activité antagoniste modérée sur l'adenylate-cyclase sensible à la dopamine dans la rétine de bovidé (cf. page 40). Sur la base de ces résultats, il est proposé que les récepteurs dopaminergiques marqués par le ^3H -spiropéridol dans la rétine de bovidé appartiennent au type D_1 .

CONCLUSION

La technique de binding a été utilisée dans la rétine de mammifère pour la caractérisation du récepteur à la dopamine. Les sites de liaison marqués spécifiquement par le ^3H -spiropéridol répondent aux caractéristiques pharmacologiques d'un récepteur dopaminergique du type D_1 . Certaines différences ont été mises en évidence par rapport à des préparations de cortex frontal et de striatum, particulièrement en ce qui concerne la puissance

relative des neuroleptiques dans des courbes de déplacement. Ces différences peuvent être imputées aux caractéristiques d'innervation de ces différentes régions du SNC, et présentent un intérêt tout particulier pour l'estimation des composantes dopaminergiques et sérotonergiques des neuroleptiques.

Dès lors l'étude pharmacologique de la liaison spécifique du ^3H -spiropéridol aux récepteurs dopaminergiques dans la rétine apparaît comme un modèle approprié pour l'évaluation de l'affinité sélective pour le récepteur à la dopamine des substances psychotropes.

REFERENCES

1. McLENNAN, H. (1963) The concept of chemical transmission. In : Synaptic transmission, Philadelphia, W.B. Saunders, p. 23.
2. CURTIS, D.R. (1961) The identification of mammalian inhibitory transmitters. In : Florey, E., ed. Nervous inhibition, Proceedings of the second Friday Harbor Symposium, N.Y. Pergamon Press Inc., p. 342.
3. KRNJEVIC, K. (1974) Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. Physiol. Rev. 54, 418.
4. BJÖRKLUND, A., FALCK, B. and OWMAN, Ch. (1972) Fluorescence microscopic and microspectrofluorometric techniques for the cellular localisation and characterization of biogenic amines. In "Methods of Investigative and Diagnostic Endocrinology". (J.E. Rall and I. Kopin, eds.). North Holland Publishing Corp., The Hague, p. 318.
5. FALCK, B., HILLARP, N., THIEME, G. and TORP, A. (1963) Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10, 348.
6. BJÖRKLUND, A., EHINGER, B. and FALCK, B. (1968) A method for differentiating dopamine from noradrenaline in tissue sections by microspectrofluorometry. J. Histochem. Cytochem. 16, 263.
7. KRAMER, S.G., POTTS, A.M. and MAGNALL, Y. (1971) Dopamine : A retinal neurotransmitter. II. Autoradiographic localization of ³H-dopamine in the retina. Invest. Ophthal. 10, 617-624.
8. DA PRADA, M. and ZÜRCHER, G. (1976) Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the femtomole range. Life Sci. 19, 1161-1174.
9. HORNYKIEWICZ, O. (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. Pharmacol. Rev., 925-964.
10. BROWN, J.H., MAKMAN, M.H. (1972) Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine-3'-5'-cyclic monophosphate formation in intact retina. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 69, 539-543.

11. KEBABIAN, J.W., PETZOLD, G.L. and GREENGARD, P. (1972) Dopamine-sensitive adenylate-cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "Dopamine receptor". Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 69, 2145-2149.
12. AHN, H.S., FELDMAN, S.C., MAKMAN, M.H. (1979) Posterior pituitary adenylate-cyclase : stimulation by dopamine and other agents. Brain Res. 166, 422-425.
13. von HUNGEN, K. and ROBERTS, S. (1973) Adenylate-cyclase receptors for adrenergic neurotransmitters in rat cerebral cortex. Eur. J. Biochem. 36, 391-401.
14. HORN, A.S., CUELLO, A.C., MILLER, R.J. (1974) Dopamine in the mesolimbic system of the rat brain : endogenous levels and the effects of drugs on the uptake mechanism and stimulation of adenylate cyclase activity. J. Neurochem. 22, 265-270.
15. KEBABIAN, J.W. and CALNE, D.B. (1979) Multiple receptors for dopamine. Nature 277, 93-96.
16. CLEMENT-CORMIER, Y.C., KEBABIAN, J.W., PETZOLD, G.L. and GREENGARD, P. (1974) Dopamine-sensitive adenylate-cyclase in mammalian brain : a possible site of action of antipsychotic drugs. Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1113-1117.
17. BROWN, J.H. and MAKMAN, M.H. (1973) Influence of neuroleptic drugs and apomorphine on dopamine-sensitive adenylate cyclase of retina. J. Neurochem. 21, 477-479.
18. KAROBATH, M. and LEITICH, H. (1974) Antipsychotic drugs and dopamine-stimulated adenylate-cyclase prepared from corpus striatum of rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 2915-2918.
19. MILLER, R.J., HORN, A.S. and IVERSEN, L.L. (1974) The action of neuroleptic drugs on dopamine-stimulated adenosine cyclic 3',5'-monophosphate production in rat neostriatum and limbic forebrain. Mol. Pharmacol. 10, 759-766.
20. SEEMAN, P., LEE, T., CHAN-WONG, M., TEDESCO, J. and WONG, K. (1976) Dopamine receptors in human and calf brains, using ³H-apomorphine and an antipsychotic drug. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 4354-4358.

21. BURT, D.R., ENNA, S.J., CREESE, I. and SNYDER, S.H. (1975) Dopamine receptor binding in the corpus striatum of mammalian brain. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 72, 4655-4659.
22. CREESE, I., BURT, D.R. and SNYDER, S.H. (1975) Dopamine receptor binding : differentiation of agonist and antagonist states with ^3H -dopamine and ^3H -haloperidol. Life Sci. 17, 993-1002.
23. CUATRECASAS, P. (1974) Membrane receptors. Ann. Rev. Biochem. 43, 169-214.
24. FREYCHET, P., ROTH, J. and NEVILLE, D.M. Jr. (1971) Insulin receptor in the liver : specific binding of ^{125}I -insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 1833-1837.
25. BAULIEU, E.-E. (1975) Steroid receptors and hormone receptivity : new approaches in pharmacology and therapeutics. J. Am. Med. Assoc. 234, 321-363.
26. SNYDER, S.H. and BENNET, J.P. Jr. (1972) Neurotransmitter receptors in the brain : Biochemical identification. Ann. Rev. Physiol. 34, 153-175.
27. GREENBERG, D.A. and SNYDER, S.H. (1977) Selective labelling of α -noradrenargic receptors in rat brain with ^3H -dihydroergo-kryptine. Life sci. 20, 927-932.
28. LEFKOWITZ, R.J. and WILLIAMS, L.T. (1977) Catecholamine binding to the β -adrenergic receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 515-519.
29. YAMAMURA, H.I. and SNYDER, S.H. (1974) Muscarinic cholinergic binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 1725-1729.
30. KARLIN, A. and COWBURN, D.A. (1973) The affinity-labelling of partially purified acetylcholine receptor from electric tissue of Electrophorus. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 3636-3640.
31. ZUKIN, S.R., YOUNG, A.B. and SNYDER, S.H. (1974) Gamma-amino-butyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 71, 4802-2807.

32. MOHLER, H. and OKADA, T. (1977) GABA receptor binding with ^3H -bicuculline methiodide in rat CNS. Nature (Lond.) **267**, 65-67.
33. YOUNG, A.B. and SNYDER, S.H. (1973) Strychnine binding associated with glycine receptor in the central nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **70**, 2832-2836.
34. NAKATA, Y., KUSAKA, Y., SEGAWA, T., YAJIMA, H. and KITAGAWA, K. (1978) Substance P : Regional distribution and specific binding to synaptic membranes in rabbit central nervous system. Life Sci. **22**, 259-268.
35. PERT, C.B. and SNYDER, S.H. (1973) Opiate receptor : demonstration in nervous tissue. Science **179**, 1011-1014.
36. PERT, C.B. and SNYDER, S.H. (1974) Opiate agonists and antagonists affected differentially by sodium. Mol. Pharmacol. **10**, 868-879.
37. BURT, D.R., CREESE, I. and SNYDER, S.H. (1976) Properties of ^3H -haloperidol and ^3H -dopamine binding associated with dopamine receptors in calf brain membranes. Mol. Pharmacol. **12** 800-812.
38. ENNA, S.J. and SNYDER, S.H. (1976) Gamma amino butyric acid (GABA) receptor binding in mammalian retina. Brain Res. **115**, 174-179.
39. MÜLLER, W.E. (1977) Muscarinic cholinergic receptor binding in bovine retina. Neurosc. Lett. **5**, 345-349.
40. FUXE, K., HÖKFELT, T., OLSON, L. and UNGERSTEDT, U. (1977) Central monoaminergic pathways with emphasis on their relation to the so called "extra pyramidal motor system". Pharmac. Ther. B. **3**, 169-210.
41. HÄGGENDAL, J. and MALMFORS, T. (1963) Evidence of dopamine-containing neurons in the retina of the rabbit. Acta physiol. Scand. **59**, 295.
42. CARLSSON, A. (1977) Does dopamine play a role in schizophrenia ? Psychological Med. **7**, 583-597.
43. CREESE, I., SCHNEIDER, R. and SNYDER, S.H. (1977) ^3H -spiroperidol labels dopamine receptors in pituitary and brain. European J. of Pharmacology **46**, 377-381.

44. CARON, M.G., RAYMOND, V., LEFKOWITZ, R.J. and LABRIE, F. (1977) Identification of dopaminergic receptors in anterior pituitary : correlation with the dopaminergic control of prolactin release. Fed. Proc. 36, 278.
45. McLEOD, R.M. and LEHMEYER, J.E. (1974) Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. Endocrinology 94, 1077-1085.
46. SEYBOLD, V.S., MILLER, J.W. and LEWIS, P.R. (1978) Investigation of a dopaminergic mechanism for regulating oxytocin release. J. Pharmacol. Exp. Ther. 202, 605-610.
47. EHINGER, B. (1977) Synaptic connections of dopaminergic retinal neurons. In : Advances in Biochem. Psychopharmacol. 16, 299-306, E. Costa and G.L. Gessa, Eds. Raven Press, N.Y.
48. MALMFORS, T. (1963) Evidence of adrenergic neurons with synaptic terminals in the retina of rats demonstrated with fluorescence and electron microscopy. Acta Physiol. Scand. 58, 99-100.
49. KRAMER, S.G. (1976) Dopamine in retinal neurotransmission. In : Transmitters in the visual process, 165-198, Bonting, S.L. ed. Pergamon Press, Oxford.
50. NEAL, M.J. (1976) Amino acid transmitter substances in the vertebrate retina. Gen. Pharmac. 7, 321-332.
51. EHINGER, B. (1976) Biogenic amines as transmitters in the retina. In : Transmitters in the visual process, 146-163, Bonting, S.L. ed., Pergamon Press, Oxford.
52. DRUJAN, B.D., DIAZ BORGES, J.M. and ALVAREZ, N. (1965) Relationship between the contents of adrenaline, noradrenaline and dopamine in the retina and its adaptational state. Life Sci. 4, 473.
53. DA PRADA, M. (1977) Dopamine content and synthesis in retina and N. Accumbens Septi : Pharmacological and light-induced modifications. In : "Advances in Biochemical Psychopharmacology 1b, E. Costa and G.L. Gessa eds), Raven Press.
54. IUVONE, P., GALLI, C.L., GARRISON-GUND, C.K. and NEFF, N.H. (1978) Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. Science 202, 901-902.

55. MUSTAKALLIO, A. (1967) Monoamine oxydase activity in the various structures of the mammalian eye. Histochemical staining and quantitative chemical study. Acta Ophtamol. 93, 1.
56. BURT, D.R. (1978) Criteria for receptor identification. In : Neurotransmitter receptor binding, pp. 41-55 (eds. H.I. Yamamura, S.J. Enna and M.J. Kuhar). Raven Press, N.Y.
57. MAGISTRETTI, P.J. and SCHORDERET, M. (1979) Dopamine receptors in bovine retina : characterization of the ^3H -spiroperidol binding and its use for screening dopamine receptor affinity of drugs. (Soumis pour publication).
58. MAGISTRETTI, P.J. and SCHORDERET, M. (1978) Pharmacological and binding studies of retinal dopamine receptors. Experientia 34, 927.
59. MAGISTRETTI, P.J. and SCHORDERET, M. (1979) Stereospecific interactions of neuroleptics with ^3H -spiroperidol binding in bovine retina. Experientia (in the press).
60. LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
61. LEYSEN, J.E., GOMMEREN, W. and LADURON, P.M. (1978) Spiperone : a ligand of choice for neuroleptic receptors :
1. kinetics and characteristics of in vitro binding ;
2. regional distribution and in vivo displacement of neuroleptic drugs ;
3. subcellular distribution of neuroleptic drugs and their receptors in various rat brain areas.
Biochemical Pharmacol. 27, 307-328.
62. FIELDS, J.Z., REISINE, T.D. and YAMAMURA, H.I. (1977) Biochemical demonstration of dopaminergic receptors in rat and human brain using ^3H -spiroperidol. Brain Res. 136, 578-584.
63. MØELLER-NIELSEN, I., PEDERSEN, V., NYMARK, M., FRANCK, K.F., BOECK, V., FJALLAND, B. and CHRISTENSEN, A.V. (1973) The comparative pharmacology of flupenthixol and some reference neuroleptics. Acta Pharmacol. Toxicol (Kbh.) 33, 353-362.

64. MILLER, R.J., HORN, A.S. and IVERSEN, L.L. (1975) Effect of butaclamol on dopamine-sensitive adenylate-cyclase in the rat striatum. J. Pharm. Pharmac. 27, 212-213.
65. MAGISTRETTI, P.J. and SCHORDERET, M. (1978) Differential effects of benzamides and thioxanthenes on dopamine-elicited accumulation of cAMP in isolated rabbit retina. Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 303, 189-191.
66. SOVILLA, J.Y., MAGISTRETTI, P.J. and SCHORDERET, M. (1979) Potentiation of apomorphine-induced climbing behaviour in mice by d-LSD. Progress in neuropsychopharmacology (in the press).
67. PIERI, L., PIERI, M., HAEFELY, W. (1974) LSD as an agonist of dopamine receptor in the striatum. Nature 252, 586-588.
68. BENNETT, J.P., Jr. and SNYDER, S.H. (1976) Serotonin and lysergic acid diethylamide binding in rat brain membranes : relationship to postsynaptic serotonin receptors. Mol. Pharmacol. 12, 373-389.
69. BURT, D.R., CREESE, I. and SNYDER, S.H. (1976) Binding interactions of lysergic acid diethylamide and related agents with dopamine receptors in the brain. Mol. Pharmacol. 12, 631-638.
70. LOVELL, R.A., FREEDMAN, D.X. (1976) Stereospecific receptor sites for d-lysergic acid diethylamide in rat brain : effects of neurotransmitters, amine antagonists and other psychotropic drugs. Mol. pharmacol. 12, 620-630.
71. AGAJANIAN, G.K., HAIGLER, H.J. and BLOOM, F.E. (1972) Lysergic acid diethylamide and serotonin : direct actions on serotonin-containing neurons in rat brain. Life Sci. Part I, Physiol. Pharmacol. 11, 615-622.
72. Von HUNGEN, K., ROBERTS, S. and HILL, D.F. (1975) Serotonin-sensitive adenylate cyclase activity in mammalian brain. Brain Res. 84, 257-267.
73. Von HUNGEN, K., ROBERTS, S. and HILL, D.F. (1974) LSD as an agonist and antagonist at central dopamine receptors. Nature 252, 588-589.

74. SCHORDERET, M. (1976) Direct evidence for the stimulation of rabbit retina dopamine receptor by ergot alkaloids. Neurosc. Lett. 2, 87-91.
75. LEYSEN, J.E., NIEMECCERS, J.P., TOLLENAERE, J.P. and LADURON, P.M. (1978) Serotonergic component of neuroleptic receptors. Nature 272, 168-171.
76. PEDIGO, N.W., REISINE, T.D., FIELDS, J.Z. and YAMAMURA, H.I. (1978) ³H-spiroperidol binding to two receptor sites in both the corpus striatum and frontal cortex of rat brain. Eur. J. Pharmacol. 50, 451-453.
77. LEYSEN, J.E. and LADURON, P.M. (1977) A serotonergic component of neuroleptic receptors. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 230, 337-339.
78. BENNET, J.E. and SNYDER, S.H. (1976) Serotonin and lysergic acid diethylamide binding in rat brain membranes : relationship to postsynaptic serotonin receptors. Mol. Pharmacol. 12, 373-389.
79. LOVELL, R.A. and FREEDMAN, D.X. (1976) Stereospecific receptor sites for d-lysergic acid diethylamide in rat brain : effects of neurotransmitters, amine antagonists, and other psychotropic drugs. Mol. Pharmacol. 12, 620-630.
80. CREESE, I. and SNYDER, S.H. (1978) ³H-spiropéridol labels serotonin receptors in rat cerebral cortex and hippocampus. Europ. J. Pharmacol. 49, 201-202.
81. CROW, T.J. (1979) What is wrong with dopaminergic transmission in schizophrenia ? TINS, Vol 2, No 2, 52-55.
82. YOUNG, A.B. and SNYDER, S.H. (1974) The glycine receptor : evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 4002-4005.
83. SNYDER, S.H. and BENNET, J.P. (1975) Biochemical identification of the post-synaptic serotonin receptor in mammalian brain. In : Pre- and Postsynaptic Receptors. Marcel Dekker, N.Y., E. Usdin and W.E. Bunney Eds. 191-206.

84. GOLDBERG, L.I., VOLKMAN, P.H. and KOHLI, J.D. (1978) A comparison of the vascular dopamine receptor with other dopamine receptors. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 18, 57-79.
85. IVERSEN, L.L., HORN, A.S. and MILLER, R.J. (1975) Structure activity relationship for agonist and antagonist drugs, at pre- and postsynaptic dopamine receptor sites in rat brain. In : Pre- and Post-Synaptic receptors, E. Usdin and W.E. Bunney Eds., 207-243, Dekker, New York.
86. SCHORDERET, M. (1977) Pharmacological characterization of the dopamine-mediated accumulation of cyclic AMP in intact retina of rabbit. Life Sci. 20, 1741-1748.
87. HOROWSKI, R.H. and WACHTEL, H. (1976) Direct dopaminergic action of lisuride hydrogen maleate, and ergot derivative, in mice. Eur. J. Pharmacol. 36, 373-383.
88. KELLER, H.H. and Da PRADA, M. (1979) Central dopamine agonistic activity and microsomal biotransformation of lisuride, lergotrile and bromocryptine. Life Sci. 24, 1211-1222.
89. PIERI, L., KELLER, H.H., BURKHARD, W. and Da Prada, M. (1978) Effects of lisuride and LSD on cerebral monoamine systems and hallucinosis. Nature 272, 278-280.
90. TRABUCCHI, M., LONGONI, R., FRESIA, P. and SPANO, P.F. (1975) Sulpiride : a study of the effects on dopamine receptors in rat neostriatum and limbic forebrain. Life Sci. 17, 1551-1556.
91. THEODOROU, N., CROCKETT, M., JENNER, P. and MARSDEN, C.D. (1979) Specific binding of ³H-sulpiride to rat striatal preparations. J. Pharm. Pharmacol. 31, 424-426.
92. LINDVALL, O., BJÖKLUND, A., MOORE, R.Y. and STENEVI, O. (1974) Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. Brain Res. 81, 325-331
93. UNGERSTEDT, U. (1971) Stereotoxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. Acta Physiol. Scand., Suppl. 367, 69.
94. DOWLING, J.E. (1970) Organisation of vertebrate retinas. (The Jonas H. Friedenwald Memorial Lecture). Invest. Ophthalmol. 9, 655-680.

